



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

EL CONOCIMIENTO DE LAS POBLACIONES DEL PASADO
A TRAVÉS DE LOS RESTOS ÓSEOS:

PUESTA EN MARCHA DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN QUÍMICA DE COLÁGENO DE HUESOS ARQUEOLÓGICOS

**PROYECTO FIN DE CARRERA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA Y BIODIVERSIDAD**

María Padilla Martínez



LABORATORIO
DE POBLACIONES
DEL PASADO



ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. El hueso como material de estudio.....	2
2.2. Composición del tejido óseo.....	3
2.3. Análisis sobre la fracción orgánica: radioisótopos e isótopos estables.....	4
2.4. Extracción de colágeno y criterios de calidad.....	8
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
4.1. Material biológico.....	12
4.2. Extracción de colágeno.....	13
4.3. Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas.....	14
4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y visualización mediante tinción.....	15
5. RESULTADOS.....	17
6. DISCUSIÓN.....	21
7. CONCLUSIONES.....	24
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	26
9. REFERENCIAS.....	27

1. RESUMEN

Este proyecto se ha centrado en el establecimiento de un protocolo de extracción de colágeno de restos óseos, que ha permitido extraer este componente de una manera más o menos rutinaria, sin contaminantes, y además con un buen rendimiento, en el Laboratorio de Poblaciones del Pasado (Dpto. de Biología) de la Universidad Autónoma de Madrid. El material utilizado para este propósito han sido restos óseos humanos procedentes de un osario excavado en Almansa, datado entre los siglos XIII-XVIII. El protocolo seguido para su extracción ha sido el empleado por el Laboratorio de Geocronología del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC) derivado del método descrito por Longin (1971) con modificaciones (DeNiro y Epstein, 1981), en el que existen tres pasos fundamentales: la desmineralización de la muestra, la eliminación de contaminantes orgánicos, y la gelatinización o solubilización del colágeno. El objetivo de ello es aplicar técnicas modernas al estudio del registro osteoarqueológico como el análisis de isótopos estables de carbono (C) y nitrógeno (N) ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) a través de IRMS (Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas), que permiten conocer aspectos biológicos de estas poblaciones tales como los referidos a la alimentación e incluso a los patrones de destete.

Palabras clave: Extracción de colágeno óseo; Dieta; Isótopos estables; Relación atómica C:N; Relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$; Relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$; Rendimiento de extracción.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El hueso como material de estudio

Para el estudio de las poblaciones humanas del pasado, y el conocimiento sobre aspectos de la vida de éstas, los restos óseos conforman un material de estudio de primer orden. Representan la evidencia más directa sobre la biología de los individuos (Larsen. 2002), ya que es en la mayoría de los casos, el único tejido de origen orgánico que se preserva (Ambrose y Krigbaum, 2003).

El estudio de este registro osteoarqueológico se ha enfocado generalmente desde una perspectiva macroscópica. Actualmente, sin embargo, es común que se realicen otros análisis (histológicos, químicos, moleculares, etc.) sobre los restos óseos que amplían y complementan la información que estos proporcionan. El estudio de la composición química e isotópica de los huesos es utilizada, por ejemplo para su

datación, así como para la reconstrucción de paleodietas, ambientes y patrones de migración (Ambrose y Krigbaum, 2003; Knudson y Stojanowski, 2008). No obstante, la información retenida en estos restos no es siempre un reflejo fiel de la actividad biológica del individuo, ya que durante el periodo en que han permanecido enterrados es posible que hayan sufrido una serie de alteraciones tafonómicas. Concretamente son los procesos diagenéticos (alteraciones físico-químicas producidas una vez se ha producido el enterramiento) los que alteran la composición química del hueso y su estructura debido a las condiciones del terreno en que ha sido depositado (O'Connor, 2008), produciéndose la disolución parcial o total de fracción mineral, erosión, precipitación de componentes presentes en el suelo, recristalización, intercambio de iones por adsorción y difusión, e hidrólisis (Castaños *et al.*, 2010). Como se detalla en el siguiente apartado en el hueso pueden diferenciarse dos fracciones, una inorgánica (mineral) y otra orgánica (proteica), y aunque la diagénesis ocurre en ambas, es el componente mineral el que sufre una alteración mayor de su composición al estar en contacto directo con el medio. De hecho, esta matriz mineral en la que se encuentran embebidas las proteínas en íntima asociación con la hidroxiapatita, las protege de la degradación causada por la temperatura y los agentes químicos tras la muerte (Schmidt-Schultz y Schultz, 2004). Por este motivo se ha optado en los análisis químicos por la extracción y estudio del componente orgánico, para minimizar así la influencia de los contaminantes presentes en el suelo (Katzenberg, 1992).

2.2. Composición del tejido óseo: la fracción orgánica

El componente estructural del hueso es el tejido óseo, un tipo de tejido conjuntivo especializado compuesto por diversos tipos celulares (células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) y una matriz mineralizada que le confiere las propiedades físicas específicas de dureza y resistencia propias para su función de soporte esquelético. Sobre la matriz ósea se distinguen dos fracciones, una orgánica y otra inorgánica cuyas proporciones en peso seco son 35% y 65% respectivamente (Welsch, 2009). El componente principal de la fracción orgánica es colágeno, concretamente colágeno tipo I, que constituye el 90%. El resto de componentes orgánicos son proteínas como oseonectina, osteoporina u osteocalcina, proteoglucanos y lípidos (Ross y Pawlina, 2007). Por otro lado, la fracción inorgánica está constituida fundamentalmente por hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), un depósito de

fosfato cálcico en forma cristalina, además de carbonatos (CO_3^{2-}), magnesio (Mg^{2+}) y sodio (Na^+) (Welsch, 2009).

Precisamente es esa matriz mineral lo que confiere al hueso su dureza y permite su durabilidad en el tiempo aunque deje de ser un tejido vivo, protegiendo de la degradación al mismo tiempo a la fracción orgánica. De hecho, muchas de las técnicas analíticas que se realizan actualmente sobre restos osteoarquelógicos se basan en la extracción de su componente orgánico, que generalmente se ha identificado como colágeno óseo (tipo I) al ser su elemento mayoritario. La unidad constituyente de esta proteína fibrosa, es el tropocolágeno, molécula cuya estructura es una triple hélice conformada por dos cadenas polipeptídicas α -1, y una cadena α -2, que difieren ligeramente en cuanto a su composición y secuencia aminoacídica. El peso molecular del tropocolágeno es de algo más de 300KDa, correspondiendo 100KDa aproximadamente a cada cadena (Talwar y Srivastava, 2003).

La disposición de estas fibras de colágeno en la matriz varía dependiendo del estado de madurez en el que se encuentre el tejido óseo. Mientras que el hueso inmaduro (típico de las primera etapas del desarrollo y de huesos sometidos remodelación) presenta una disposición entretejida y desorganizada de las fibras, en el hueso maduro (forma principal en adultos) estas se encuentran dispuestas de una forma ordenada (Ross y Pawlina, 2007). A su vez, el tejido óseo se clasifica en compacto y esponjoso dependiendo de la organización estructural que presente. Así, la superficie externa de los huesos está formada por una capa densa y compacta de tejido óseo (tipo compacto), mientras que la parte interna está formada por una malla de aspecto esponjoso (tejido óseo esponjoso). La diferencia esencial entre ambos tipos de organización es la densidad de tejido óseo presente en cada una de ellas, lo que hace que la densidad de matriz ósea y por tanto de colágeno varíe entre ambas tipologías (Ross y Pawlina, 2007). Atendiendo a este criterio, las zonas de tejido óseo compacto de los huesos son las que presentan una cantidad mayor de fibras colagénicas.

2.3. Análisis sobre la fracción orgánica del hueso: radioisótopos e isótopos estables

En la naturaleza, los elementos químicos se encuentran como una mezcla de isótopos. Definiendo como isótopo a la forma de un elemento que presenta el mismo número atómico (n° de protones), pero distinta masa atómica (n° de neutrones) (Reyes,

2004). Dentro de la variedad de formas que puede darse dentro de un elemento se distinguen: los isótopos radiactivos, donde el núcleo inestable tiende a estabilizarse perdiendo energía y partículas atómicas (decaimiento radiactivo); y los isótopos estables cuya masa atómica permanece constante en el tiempo (Tykot, 2006). El carbono, por ejemplo, presenta ambas formas isotópicas: ^{14}C (radioisótopo), ^{13}C y ^{12}C (isótopos estables). La datación por ^{14}C o el análisis de isótopos estables para el conocimiento de paleodietas son algunos ejemplos de las aplicaciones que tiene hoy la purificación del colágeno óseo.

En el caso de la datación por radiocarbono, lo que interesa es saber la cantidad de radioisótopo ^{14}C que contiene la muestra, pues conociendo su periodo de semidesintegración ($t_{1/2} = 5568$ años) es posible estimar en qué momento el organismo dejó de incorporar este isótopo de carbono.

En cuanto al estudio de isótopos estables sobre restos óseos, hoy constituye una herramienta muy utilizada para la reconstrucción de paleodietas. Al ser el hueso un tejido dinámico sometido a una remodelación continua, durante la vida del individuo el hueso fija constantemente elementos a su matriz cuya entrada principal al organismo se produce a través de la vía alimentaria. Los elementos que habitualmente se analizan son C y N, ambos presentes en la fracción orgánica del hueso, cuyas formas isotópicas estables son: ^{12}C y ^{13}C ; ^{14}N y ^{15}N . Las propiedades físicas de cada uno de estos isótopos varían debido a la diferencia en su estructura y la masa del núcleo, al igual que el comportamiento químico, y lo mismo ocurre con los compuestos de los que forman parte. Así, los enlaces formados por los isótopos ligeros (^{12}C ; ^{14}N) son menos energéticos que los de los isótopos pesados (^{13}C ; ^{15}N). Esto hace que durante una reacción bioquímica, por ejemplo la fotosíntesis, las moléculas que contienen el isótopo ligero (^{12}C) reaccionen a una velocidad ligeramente superior a la de las moléculas pesadas (^{13}C), provocando un “enriquecimiento” del isótopo ligero en los productos. Y lo mismo ocurre en los procesos físicos, la difusión de los isótopos ligeros es mayor que la de los pesados. El resultado de esto es que la composición isotópica de los productos varía respecto a la de los sustratos, fenómeno al que se denomina fraccionamiento isotópico (Hoefs, 2009).

Pues bien, el fraccionamiento isotópico hace que distintas agrupaciones de organismos (alimentos) presenten unas relaciones isotópicas de C y N concretas ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$; $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Estas composiciones isotópicas se expresan como valor δ ,

representando la desviación relativa respecto a un valor estándar, que con el objetivo de amplificarla se multiplica por mil ($\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$) (Fry, 2006):

$$\delta^{\text{PI}}\text{‰} = \frac{\text{PI} / \text{LI}_{(\text{muestra})} - \text{PI} / \text{LI}_{(\text{estándar})}}{\text{PI} / \text{LI}_{(\text{estándar})}} \times 1000$$

^PI: isótopo pesado; ^LI: isótopo ligero

El estándar usado para calcular el valor $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ es PDB (PeeDee Belemnite), un carbonato procedente de un fósil (*Belemnite americana*), de la formación cretácica Pee Dee de Carolina del Sur (EEUU). Para el N el estándar utilizado es el N₂ atmosférico (Fry, 2006).

La capacidad para la reconstrucción de paleodietas se basa en el conocimiento de la relación existente entre los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ de la dieta de un individuo y los valores reflejados en alguno de sus tejidos, ya que los componentes que estos incorporan forman parte de los alimentos ingeridos (DeNiro y Epstein, 1978; 1981; DeNiro y Schoeninger, 1983). En el caso de los restos osteoarqueológicos, este análisis se puede abordar tanto sobre la fracción mineral (en el caso del carbono) (Ambrose y Krigbaum, 2003), como sobre la fracción orgánica (Tykot, 2006), cada uno de ellos aportando una información específica. Así, los átomos de C y N que conforman el colágeno y el resto de proteínas no colagénicas, proceden de las proteínas ingeridas en la dieta (Ambrose y Krigbaum, 2003; Tykot, 2006), y mediante el conocimiento de los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ es posible determinar el origen de este aporte proteico.

La relación isotópica del C se ha empleado en algunos casos para determinar la proporción del tipo de alimento vegetal que componía la dieta, referido a plantas C3 y C4 (Vogel y van der Merwe, 1977). La base de esta aproximación, es que las plantas con metabolismo C3 presentan valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ más negativos que las que tiene un metabolismo C4, debido esencialmente al fraccionamiento diferencial que generan las enzimas propias de cada metabolismo (Rubisco y PEPc) durante la fijación del CO₂ (Taiz y Zeiger, 2006). Así, conociendo el valor $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ del colágeno, es posible relacionarlo con el consumo de estos tipos vegetales, presentando valores más negativos los consumidores de plantas C3, y menos negativos los consumidores de plantas C4 (Fig.1). De este modo, Vogel y van der Merwe (1977) realizaron un estudio sobre el momento de la adquisición de la agricultura por parte de algunos pueblos norteamericanos que basaron esta práctica en el cultivo de plantas C4 como el maíz.

Por otro lado, la relación isotópica del C puede indicar también la proporción del aporte de recursos marinos y terrestres. Una dieta basada en alimentos terrestres presenta valores $\delta^{13}\text{C}$ más negativos, de al menos -19‰ (dependiendo en gran medida del metabolismo de las plantas consumidas como ya se ha dicho), mientras que la dieta de una población con una alta dependencia de recursos marinos presenta valores menos negativos, entre -14‰ y -16‰ (Schoeninger *et al.*, 1983). Estos valores se deben a que entre los organismos pertenecientes a cada uno de estos ecosistemas existe una diferencia en los valores $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente 7‰ , siendo el valor $\delta^{13}\text{C}$ del carbonato disuelto en el medio marino próximo a 0‰ y el del carbono atmosférico -7‰ . Esta diferencia permite estimar el aporte de recursos marinos en la dieta de una población siempre que no exista consumo de plantas C4 ya que ambos valores $\delta^{13}\text{C}$ se superponen (Katzenberg, 1992).

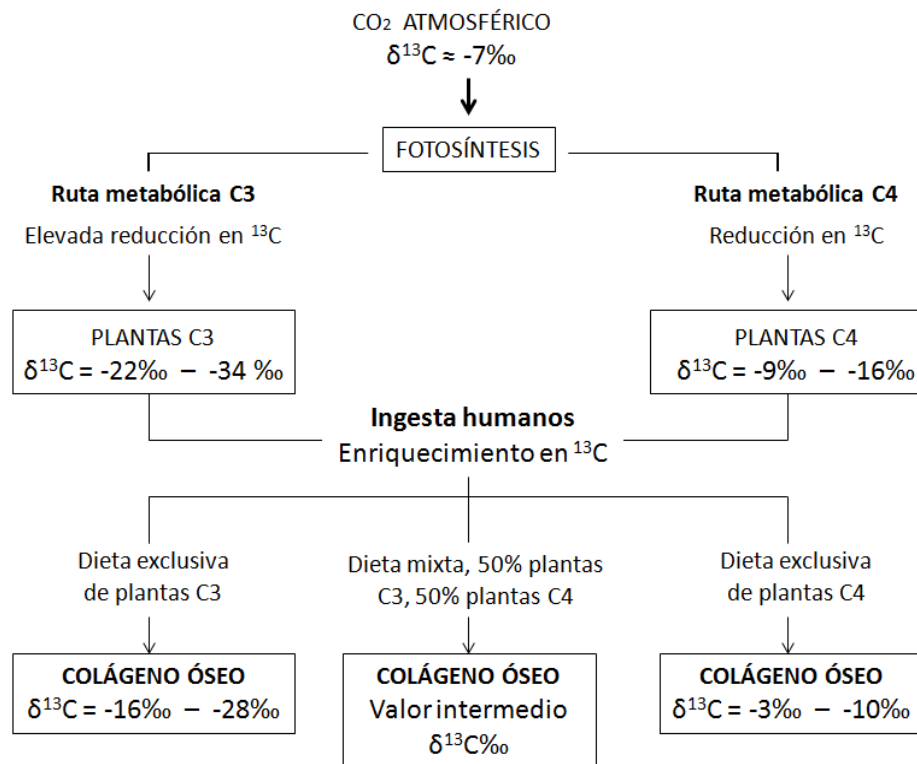


Figura 1. Esquema del fraccionamiento isotópico al que está sometido el ^{13}C durante la fijación de CO_2 atmosférico en la fotosíntesis de plantas C3 y C4, y durante su incorporación al colágeno óseo en humanos tras la ingesta de estos vegetales. Se indican los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ para cada tipo de planta y para el colágeno según la dieta (exclusiva en plantas C3, exclusiva en plantas C4 o consumo de ambos tipos). Modificado de Vogel y van der Merwe (1977).

Para el N se han realizado también diversos estudios que indican un incremento en $\delta^{15}\text{N}$ según se aumenta en nivel trófico, por lo que animales carnívoros presentan niveles mayores que los herbívoros (DeNiro y Epstein, 1981); este aumento se ha estimado en 3‰ a 5‰ (García Guixé, 2008). Además, se ha observado que existe una

diferencia entre los valores de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ del colágeno de poblaciones históricas con una dieta basada en recursos de origen marino (entre +14 y +20‰) y poblaciones con una alimentación basada en la agricultura (entre +6 y +12‰) siendo mayor en las primeras (Schoeninger *et al.*, 1983), por lo que también sirve, junto con los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ para determinar en qué medida la base de la dieta de una población se sustentaba en recursos marinos o terrestres. La distinción entre ambos ecosistemas se debe a la diferencia en los niveles de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ que presentan los organismos que conforman la base de la cadena trófica, pudiendo llegar a ser en plantas terrestres un 4‰ más bajo que en algas marinas (Larsen, 1999). Además, la mayor complejidad de los ecosistemas marinos hace que el número de niveles tróficos en los que tiene lugar el enriquecimiento en ^{15}N sea mayor que en los terrestres (García Guixé, 2008).

Otra información muy interesante que puede aportar el estudio de relaciones isotópicas del N es sobre el patrón de lactancia de una determinada población, complementando los estudios demográficos de poblaciones pasadas (Katzenberg, 1992). La característica principal de un lactante en este contexto, es que se encuentra en un nivel trófico superior al de su madre, y por tanto los niveles de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ que presenta son superiores a los de esta, alrededor de un 2‰ (Larsen, 1999).

El enriquecimiento que se observa en $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ en cada nivel trófico se debe al fraccionamiento del N que ocurre durante el metabolismo de las proteínas ingeridas, y aunque su mecanismo no está del todo claro, lo que parece ocurrir es que durante la eliminación de los residuos nitrogenados (urea) se excreta preferentemente ^{14}N (Balter *et al.*, 2006; McCutchan *et al.*, 2003; Rodríguez Martínez, 2010) probablemente debido a que se requiere un menor coste energético en la ruptura de los enlaces formados por este isótopo que en la ruptura de los enlaces formados por ^{15}N . Sin embargo, también es posible que niveles altos en $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ indiquen estrés nutricional o algún tipo de enfermedad metabólica en vez de la proporción de ingesta proteica animal, ya que el reciclado de proteínas propias utilizadas, por ejemplo, durante la remodelación ósea, haría aumentar la proporción de ^{15}N (Katzenberg y Lovell, 1999).

2.4. Extracción de colágeno y criterios de calidad

Durante los últimos 40 años se han desarrollado diversas técnicas y protocolos de extracción de colágeno en el ámbito de la datación por radiocarbono y análisis de isótopos estables derivados del método propuesto por Longin (1971) (Brown *et al.*,

1988; DeNiro y Epstein, 1981; Higham, *et al.*, 2006; Ramsey *et al.*, 2004). En ambos casos el análisis se basa en la caracterización isotópica de sus dos componentes mayoritarios, el carbono y el nitrógeno. Los procedimientos empleados en la extracción, por tanto, deben ser capaces de eliminar cualquier contaminante que pueda alterar los niveles de estos dos componentes en la muestra extraída. Estos contaminantes pueden ser de origen exógeno (carbonatos y sustancias húmicas) o procedentes del propio hueso (hidroxiapatita, lípidos y proteínas no colagénicas) (Ambrose, 1990). La eliminación del carbono procedente de los carbonatos presentes en el suelo se consigue fácilmente mediante un ataque ácido; en la mayoría de los casos se utiliza una solución de ácido clorhídrico (HCl). El ácido reacciona con el fosfato cálcico y los carbonatos solubilizándolos, permitiendo así la separación de las dos fracciones fundamentales del hueso, la orgánica y la inorgánica (Fig.2).

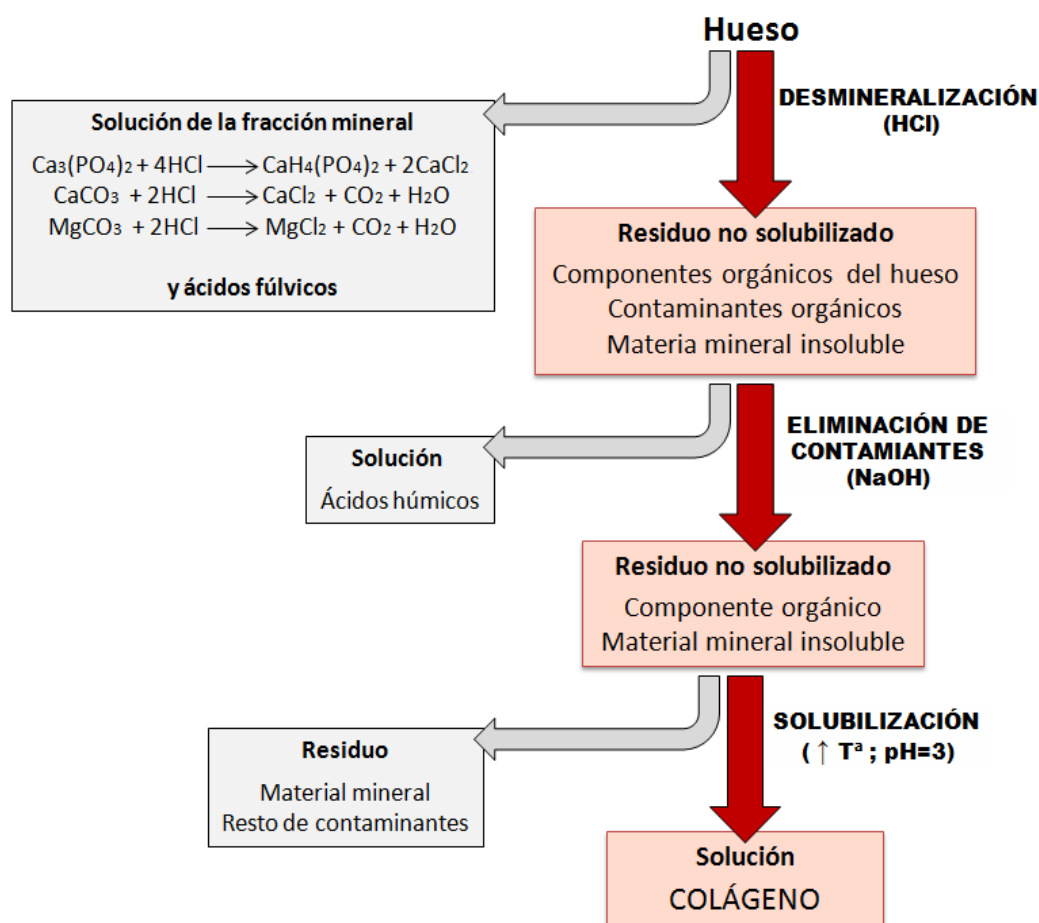


Figura 2. Diagrama que representa el tratamiento al que son sometidos los huesos para la extracción de colágeno, modificado del método descrito por Longin (1971).

En el caso de los contaminantes de nitrógeno, los responsables son los denominados compuestos húmicos, polímeros tridimensionales, de elevado peso

molecular, y de carácter ácido (ácidos fúlvicos y húmicos) que se encuentran en los suelos. Estos compuestos son restos de carbohidratos originados por plantas que a lo largo del tiempo sufren diversas modificaciones químicas, pudiendo llegar a reaccionar con el colágeno del hueso mientras este permanece enterrado. En algunos casos la eliminación de estas sustancias de origen orgánico pasa por un tratamiento con hidróxido sódico (NaOH) (DeNiro y Epstein, 1981; Schoeninger *et al.*, 1989) (Fig.2). El tratamiento con un reactivo alcalino de estas características conlleva la solubilización de los ácidos húmicos. Los ácidos fúlvicos, por su parte, son eliminados en una solución ácida (en la solución previa responsable de la desmineralización). Finalmente, tras la eliminación de los contaminantes se procede a la solubilización del residuo orgánico en agua caliente acidulada (Fig.2). En cualquier caso el componente obtenido no es colágeno propiamente dicho, ya que puede presentar restos de otras proteínas presentes en la fracción orgánica del hueso (Ambrose, 1990). Este tratamiento químico no discrimina eficazmente entre colágeno y resto de proteínas, sin embargo al ser su elemento orgánico mayoritario se considera que el colágeno es predominante en el componente extraído.

Desde el punto de vista de la osteoarqueología, las técnicas empleadas en la obtención de colágeno, se califican de técnicas destructivas, ya que la recogida de muestras implica la pérdida parcial o total de un resto óseo. En el caso de restos humanos se han propuesto protocolos de actuación para la aplicación de estas técnicas (Mays *et al.*, 2013). Es fundamental que se registre toda la información que pueda aportar el resto antes de su destrucción total o parcial, y que la recogida de muestras no condicione estudios futuros.

Los criterios utilizados para determinar la pureza y calidad del “colágeno” extraído se basan en parámetros relacionados con los dos elementos en los que se centran los análisis, el carbono y el nitrógeno. Estas medidas están referidas tanto a la proporción de carbono (C%) y de nitrógeno (N%) presente en colágeno, como a la relación atómica existente entre ellos (C:N). Pero para que estos indicadores sean fiables, la cantidad de colágeno preservado debe ser suficiente (Ambrose, 1990; Schoeninger *et al.*, 1989). Por este motivo es importante saber en qué restos se va a encontrar mayor cantidad de este componente orgánico. Así el hueso compacto es el que presenta una mayor proporción y mejor preservación debido, entre otras cosas, a la mayor densidad mineral que hacen de él el mejor “almacén”. En este sentido, la diáfisis

de los huesos largos son las estructuras anatómicas que van a presentar una mayor proporción de colágeno bien preservado. No obstante el elemento esquelético apropiado para el análisis isotópico dependerá del tipo de información que se esté buscando, y del grupo de edad al que pertenezca el individuo estudiado. En adultos la extracción de colágeno para la determinación de la dieta suele realizarse sobre huesos largos, ya que su tasa de renovación es más lenta que en el resto de huesos, recogiendo información de, al menos, los últimos 10 años de vida del individuo. Cuando los restos estudiados pertenecen a individuos infantiles y lo que se pretende conocer es el periodo de lactancia, los análisis deben realizarse sobre huesos con una tasa de renovación más rápida que reflejen cuanto antes los cambios en el aporte alimentario, como por ejemplo las costillas (Mays *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

- Puesta en marcha de un protocolo de extracción de colágeno en el Laboratorio de Poblaciones del Pasado (LAPP) que permita extraer este componente de huesos arqueológicos.
- Obtener un rendimiento en la extracción similar al obtenido por otros equipos, buscando minimizar la destrucción de material óseo.
- Comprobar que la muestra extraída no presente contaminantes que puedan afectar a los análisis isotópicos a los que van a ser sometidas.
- Analizar la relación de los isótopos estables del C y N del colágeno mediante Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas (IRMS) en las muestras seleccionadas.

En caso de cumplirse los tres primeros objetivos, el procedimiento empleado en la extracción podrá ser usado para la creación de un banco de colágeno que incluya una muestra de todos y cada uno de los individuos de todas las colecciones estudiadas en el LAPP. Dado que la política de actuación sobre los restos óseos de poblaciones medievales recuperados en actividades arqueológicas, no es la de conservar la totalidad de ellos en los museos, a largo plazo y a disposición de los investigadores; cobra mucho más sentido la recolección y almacenamiento de una muestra de colágeno de todos los individuos que en un futuro facilite análisis que permitan un mejor conocimiento de estas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

El material utilizado han sido restos óseos humanos procedentes de un osario cercano a la iglesia de Santa María de la Soledad, en Almansa (Albacete), datado entre los siglos XIII-XVIII.

El estudio se ha realizado sobre un fémur y un húmero pertenecientes a distintos individuos. En total se trataron cinco fragmentos de hueso. Tres de ellos fueron tomados de la diáfisis del fémur (F1, F2 y F3) y los otros dos del húmero (H1 y H2) (Tabla 1).

- Preparación del material

Ambos huesos fueron limpiados con agua destilada para la eliminación de tierra y otros elementos adheridos a ellos. Posteriormente, para conseguir una limpieza más eficaz, se les sumergió en un baño de ultrasonidos (*ultrasons 4*, J.P. Selecta) durante 5 minutos (200W); este procedimiento se repitió 3 veces. Tras su secado al aire, durante dos días, se procedió al molido de la muestra. Este proceso se realizó de dos formas diferentes. Los fragmentos F1, H2 y F3 se molieron “a mano” utilizando un mortero de hierro hasta conseguir un diámetro de grano menor de 1 mm, y los fragmentos F2 y H1 se molieron utilizando un mortero eléctrico de ágata (*pulverisette 2*, Fritsch) con el que se consiguió un diámetro de grano inferior a 0,84 mm.

MUESTRA	HUESO	COLECCIÓN/ REFERENCIA	ASPECTO/ OBSERVACIONES	PESO (g)
F1	Fémur dcho. Incompleto, epífisis fragmentadas	Almansa Caja 22	Color blanco, buen estado.	28,58
F2	Fémur dcho. Incompleto, epífisis fragmentadas	Almansa Caja 22	Color blanco, buen estado.	28,43
H1	Húmero. Incompleto, sin partes distales.	Almansa Caja 123	Color anaranjado, Buen estado. Muy duro, pulverización muy costosa.	28,00
H2	Húmero. Incompleto, sin partes distales.	Almansa Caja 123	Color anaranjado, Buen estado. Muy duro, pulverización muy costosa.	28,31
F3	Fémur dcho. Incompleto, epífisis fragmentadas	Almansa Caja 22	Color blanco, buen estado.	27,15

Tabla 1. Muestras seleccionadas para la extracción de colágeno.

4.2. Extracción de colágeno

En la extracción de la fracción proteica se ha seguido el protocolo utilizado en el Laboratorio de Geocronología del Instituto de Química-Física Rocasolano (IQFR-CSIC) descrito inicialmente por Longin (1971) con modificaciones (DeNiro y Epstein, 1981).

En primer lugar se llevó a cabo la desmineralización del hueso, para lo que se trató cada muestra molida con una solución de HCl 1,5M durante un periodo de tiempo variable dependiendo de la muestra (ver Tabla 2), con agitación y a temperatura ambiente. El volumen de solución empleado dependió de la muestra tratada, siendo al menos diez veces el peso de esta (ver Tabla 2). A continuación se procedió al lavado de la solución ácida mediante la adición de agua destilada y la eliminación de la fase líquida una vez el residuo sólido, contenedor de la fracción proteica, hubo sedimentado. Este procedimiento se realizó al menos cuatro veces, hasta que el líquido desechado no presentó coloración. Posteriormente el residuo sólido fue tratado con una solución de NaOH 0,125M durante 20h con agitación a temperatura ambiente. En este caso el volumen de solución empleado también correspondió a diez veces el peso de la muestra inicialmente tratada (ver Tabla 2). Tras este tratamiento se llevo a cabo, de nuevo, el lavado del residuo no solubilizado mediante el procedimiento anteriormente descrito. Una vez eliminada la fase líquida con los contaminantes disueltos, se procedió a la solubilización del colágeno en 250ml de agua acidulada con un pH=3 a 80°C durante 20h y con agitación constante, proceso denominado gelatinización. Para la obtención del agua acidulada, previamente se diluyó un pequeño volumen de HCl 1,5M en agua destilada, y esta solución es la que se fue añadiendo en muy pequeña proporción a los 250ml agua destilada hasta conseguir un pH=3. Seguidamente, tras dejar enfriar la solución y una vez el residuo insoluble hubo sedimentado, se rescató la fracción líquida (colágeno solubilizado) con una pipeta. A continuación el líquido obtenido se filtró utilizando filtros de 20µm de poro (Behring®). Por último se procedió a la concentración de la fracción aislada. Para ello se introdujeron las muestras en una estufa a 80°C hasta que el volumen se redujo a 20 ml, momento en que el concentrado se depositó en una placa de Petri de 5,5 mm de diámetro, donde se produjo la cristalización de la muestra a una temperatura que varió en cada uno de los casos (ver Tabla 2).

Este ha sido procedimiento empleado para el tratamiento de las muestras F1, F2, H2 y F3. F1 fue la primera muestra tratada en la que se ajustaron diversos procedimientos. F2 consistió básicamente en una repetición de los pasos seguidos en

F1. Una vez asegurado el procedimiento se extrajo H2, mientras que la extracción de H1 se realizó el Laboratorio de Geocronología (IQFR-CSIC). Esta muestra es la que ha servido de referente para comprobar si los ajustes introducidos han influido en el rendimiento del procedimiento o en la calidad de las muestras. Por último, la extracción de F3, consistió en la rectificación de alguno de los pasos empleados.

La Tabla 2 recoge de forma pormenorizada las variaciones procedimentales respecto al protocolo anteriormente descrito, que se llevaron a cabo en cada muestra.

MUESTRA	TRATAMIENTO QUÍMICO
F1 (MM)	<u>Desmineralización:</u> 280ml HCl 1,5M (30 min). Al quedar material sin reaccionar vuelvo a tratar con HCl 1,5M durante 1h . (Total 90 minutos). <u>Descontaminación:</u> 300ml NaOH 0,125M (20 h). <u>Gelatinización:</u> 250ml pH=3 (HCl) a 78°C (20h) Sedimentación del residuo sólido, rescate de colágeno solubilizado y filtrado (20µm) <u>Concentración y cristalización</u> a 80°C
F2 (ME)	<u>Desmineralización:</u> 300ml HCl 1,5M (30min). <u>Descontaminación:</u> 300ml NaOH 0,125M (20h). <u>Gelatinización:</u> 250ml pH=3 (HCl) a 78°C (20h) Sedimentación del residuo sólido, rescate de colágeno solubilizado y filtrado (20µm) <u>Concentración y cristalización</u> a 80°C. Cristalización en vaso de precipitados, hay que volver a disolverlo en agua destilada y volver a concentrar.
H1* (ME)	<u>Desmineralización:</u> 280ml HCl 1,5M (30 min). <u>Descontaminación:</u> 280ml NaOH 0,125M (20h). <u>Gelatinización:</u> 400ml (HCl) pH=3, 80°C (20h). Centrifugado y filtrado en placa (10 µm) <u>Concentración y cristalización.</u>
H2 (MM)	<u>Desmineralización:</u> 300ml HCl 1,5M (30 min). <u>Descontaminación:</u> 300ml NaOH 0,125M (20h). <u>Gelatinización:</u> 250 ml pH=3 (HCl), 78°C (20h). Sedimentación del residuo sólido, rescate de colágeno solubilizado y filtrado (20µm) <u>Concentración y cristalización</u> a 80°C.
F3 (MM)	<u>Desmineralización:</u> 270ml HCl 1,5M (30 min). <u>Descontaminación:</u> 270ml NaOH 0,125M (20h). <u>Gelatinización:</u> pH= 3 (HCl), 80°C (20h). Sedimentación del residuo sólido, rescate de colágeno solubilizado y filtrado (20µm) <u>Concentración y cristalización</u> en placa, 70°C.

Tabla 2. Condiciones a las que fueron sometidas cada una de las muestras extraídas. MM: molido a mano con mortero de hierro. ME: molido con molino eléctrico de ágata del Laboratorio de Geocronología (IQFR-CSIC). * Extraído en el Laboratorio de Geocronología (IQFR-CSIC).

4.3. Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas

La concentración de carbono y nitrógeno en el colágeno extraído, la relación isotópica C:N, así como los valores $\delta^{13}\text{C}\%$ y $\delta^{15}\text{N}\%$ se han determinado mediante un análisis de Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas (IRMS) realizado por el

Laboratorio de Isótopos Estables del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la UAM.

El equipo utilizado para el análisis ha sido un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas Thermo Delta V Advantage de sector magnético en modo de flujo continuo, acoplado a un analizador elemental de alta temperatura Thermo Flash 1112 con un sistema de distribución de gases modelo Thermo Conflo III. Para cada medición utilizó 1mg de muestra.

El procedimiento seguido en los análisis se resume a continuación. Una vez seleccionada la muestra se pulveriza y se encapsula en una cápsula de estaño. A continuación se quema dentro de un horno a 1000 °C en presencia de oxígeno, mediante la llamada combustión de Dumas (o combustión flash), pues las relaciones isotópicas de C y N se miden sobre muestras gaseosas: CO₂ y N₂. Dependiendo del elemento que se quiera analizar (C o N) se usan diferentes trampas para que finalmente llegue al espectrómetro de masas únicamente el gas del elemento que se quiera. Una vez dentro del espectrómetro, el gas se ioniza, se acelera y se separan sus isótopos, en presencia de un campo magnético, según su masa (Fig.3).

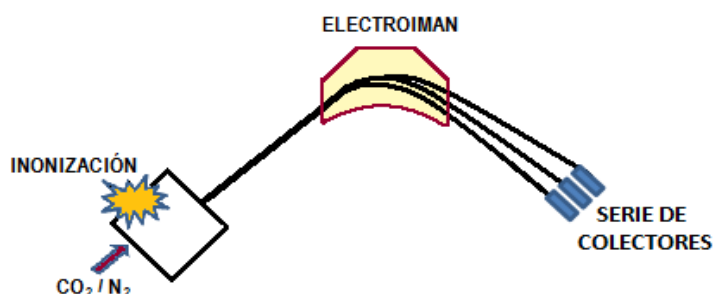


Figura 3. Esquema de un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS)

4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y visualización mediante tinción

Para confirmar la existencia de colágeno en cada una de las muestras extraídas, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los geles obtenidos se tiñeron utilizando Azul de Coomassie para comprobar la existencia de bandas proteicas que pudiesen correlacionarse con las bandas obtenidas de una muestra patrón de colágeno procedente de placenta humana (Sigma[®], c-7521).

Para ello, primero se diluyó una pequeña fracción de la muestra cristalizada (alrededor de 2 mg), en tampón *laemmli* [Tris-HCl 0.315 M pH 6.8, SDS 10% (p/v), glicerol 50% (v/v), β-mercaptoetanol 25%, EDTA 37.5 mM y azul de bromofenol

0.02% (p/v)] a una concentración 5mg/ml. A continuación las muestras fueron hervidas a 100°C, durante 3 minutos (calentador Dri-Block *DB-2D*, Techne®) para su completa dilución. Una vez que las muestras fueron diluidas en tampón *laemmli*, se cargó cada pocillo con una cantidad de proteína total extraída constante para cada gel, siendo en un caso 150µg y en otro 180µg como se detalla más adelante. La cantidad de muestra patrón del colágeno de placenta humana fue en ambos casos 150 µg. Posteriormente las proteínas contenidas en las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida:bisacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes, según el método descrito por Laemmli (1970). La electroforesis se realizó a 100 V, con tampón de electroforesis [Tris-HCl 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M y SDS al 0.01% (p/v)]. Como marcador de peso molecular de las proteínas se emplearon 3ml de patrón *Full-Range Rainbow*® (Amershan) para cada gel.

Tras la obtención de los geles se procedió a su tinción, mediante dos métodos diferentes (Método 1 y 2). El gel cargado con 150µg de proteína total extraída se tiñó utilizando el Método 1, mientras que el segundo gel, cargado con 180µg de proteína total extraída, se tiñó según el Método 2.

- **Método 1:** Tras la electroforesis se procedió a la fijación de las proteínas en una solución Metanol:acético:agua 5:1:5 (v/v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó la tinción del gel utilizando una solución de Azul de Coomassie (1g/l) en Metanol:acético:agua 5:1:5 (v/v/v). La destinción del gel se realizó en metanol al 40% hasta la visualización de las bandas.
- **Método 2:** Tras la electroforesis, las proteínas contenidas en el gel se fijaron utilizando una solución que contenía: 25% Metanol y 10% de ácido acético. Posteriormente el gel se tiñó utilizando una tinción más sensible que la anteriormente expuesta y que consiste en 3 pasos en los cuales se utiliza Azul de Coomassie a una misma concentración pero disuelto en cantidades decrecientes de isopropanol y ácido acético. Tanto la composición de las soluciones como los tiempos empleados se describen en la tabla 3. Por último se procedió a la destinción de los geles en una solución de acético al 10%.

	Isopropanol	Ac.acético	Azul de Coomassie	Agua	Tiempo
Solución I	18,75 ml	5 ml	2,25 g	23,75 ml	1h
Solución II	5 ml	5 ml	2,25 g	40 ml	1h
Solución III	-	5 ml	2,25 g	45 ml	16h

Tabla 3. Composición de cada una de las soluciones empleadas en la tinción fina y tiempos de actuación de cada una de ellas.

5. RESULTADOS

El aspecto de las muestras que resulta tras la cristalización ha sido variable como se aprecia en la Figura 4.

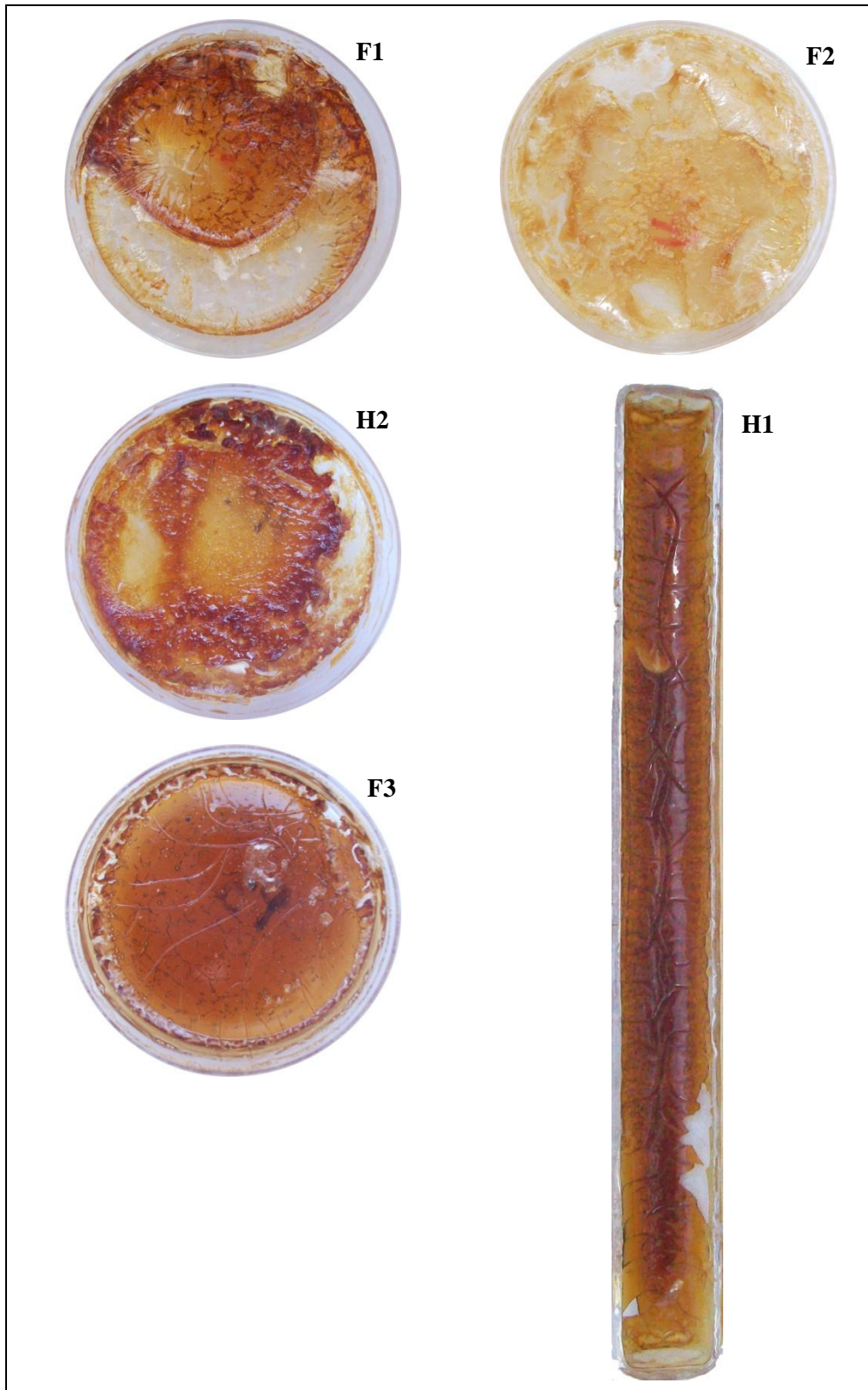


Figura 4. Fotografía de las cinco muestras de colágeno extraídas en las que se aprecia el aspecto del colágeno cristalizado.

En cuanto a la tonalidad de las muestras extraídas, F1, H2 y F3 presentan un aspecto semejante a la de la muestra de referencia, H1. La coloración de F2, sin embargo es bastante más clara. La otra característica apreciable es la homogeneidad de la cristalización, siendo la muestra de referencia H1 la más homogénea. En comparación con ella, las que más difieren son F2 y H2, presentado ambas burbujas en su relieve. Por otro lado F1, aunque no presenta un relieve tan irregular, muestra una concentración del material cristalizado en una zona concreta de la placa. F3 por su parte presenta una superficie lisa. De las cuatro muestras extraídas en la UAM, F3 es la que más se asemeja a H1.

- Rendimiento de la extracción y análisis a través de IRMS

Los valores resultantes del análisis isotópico de carbono y nitrógeno se recogen en la Tabla 3, así como los valores considerados para determinar la calidad de las muestras extraídas: rendimiento de la extracción (que se correlaciona con la concentración de colágeno en el hueso), concentración de carbono y nitrógeno en el colágeno, y relación atómica entre carbono y nitrógeno.

MUESTRA	COLÁGENO EXTRAÍDO	RENDIMIENTO	%C	$\delta^{13}\text{C}\%$	%N	$\delta^{15}\text{N}\%$	C:N
F1	4,22g	14,80%	43,2	-17,60	15,7	11,30	2,75
F2	2,80g	9,85%	40,1	-17,62	15,3	11,43	2,62
F3	2,65g	9,80%	41,4	-17,65	14,9	11,48	2,78
H1*	2g	7,14%	43,3	-18,09	14,6	11,13	2,97
H2	2,77g	9,78%	38,2	-18,20	13,5	11,43	2,82

Tabla 3. Valores hallados para cada muestra que corresponden a: peso de colágeno extraído, rendimiento de la extracción en relación a la cantidad de hueso tratado, concentración de carbono y nitrógeno en el colágeno (%C y %N) y relación isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), expresada en $\delta^{13}\text{C}\%$ y $\delta^{15}\text{N}\%$. El error asociado al equipo de medición es: $\pm 0,3\%$ para los valores δ ; $\pm 1\%$ para el C; $\pm 0,5\%$ para el N.

*Muestra de referencia extraída en el Laboratorio de Geocronología (IQFR-CSIC).

La valoración del rendimiento en cada una de las extracciones viene determinada por la cantidad de colágeno obtenido a partir de una cantidad de hueso determinada. En este caso en todas muestras extraídas se partía de una cantidad similar de hueso, alrededor de 28 gramos (ver Tabla 1). Aunque este rendimiento viene condicionado por

la concentración de colágeno en el hueso, también influye en él las condiciones a las que es sometido el ejemplar durante el tratamiento químico. De todas las muestras extraídas, el rendimiento de F1 ha sido con diferencia el mayor de todos (Tabla 3). En el extremo contrario, el menor rendimiento corresponde a la muestra de referencia H1 con un 7% (Tabla 3). El resto de muestras tratadas en la UAM, F2, H2 y F3, presentan valores muy similares entre sí, cercanos al 10% (Tabla 3).

Por otro lado, los datos referidos a los dos componentes analizados en el colágeno, carbono y nitrógeno, también muestran diferencias debidas al tratamiento químico así como a las características propias de cada hueso. De todas ellas, la medida de la proporción de carbono en el colágeno es el valor que exhibe una variación mayor entre muestras procedentes del mismo hueso (ver Tabla 3). Las extracciones realizadas a partir del húmero, H1 y H2 son las que más difieren (Tabla 3), que son además las que han sido sometidas a distintas condiciones en el tratamiento, ya que H1 fue procesada por el Laboratorio de Geocronología (IQFR-CSIC) mientras que H2 se trató en la UAM. Respeto a la concentración de nitrógeno, los valores hallados no ofrecen una variación tan patente como en el caso del carbono. En cualquier caso en las muestras H1 y H2, la segunda presenta un valor más bajo, al igual que para el carbono (Tabla 3).

Los datos acerca de la relación atómica C:N que se recoge en la Tabla 3, indican una variación mayor entre huesos que entre muestras del mismo hueso, siendo los valores ofrecidos por el húmero mayores que los hallados en el fémur. Al igual que las proporciones de cada uno de los elementos para H1 y H2, la relación C:N es más baja en este último.

Los valores que representan las relaciones isotópicas de cada hueso muestran variaciones muy ligeras. En el caso más extremo, la diferencia que se observa en el valor $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ de H1 y H2 es igual al error asociado al equipo de medición, $\pm 0,3$ (Tabla 3). Para el nitrógeno la relación isotópica es muy similar entre los dos huesos, el carbono, sin embargo, presenta unos valores distintos para el fémur y el húmero (Tabla 3). En el siguiente gráfico se representan estos datos junto con los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ asignados a determinados grupos de organismos pertenecientes a distintos ecosistemas (Fig.6). Las relaciones isotópicas de ambos huesos sitúan a los individuos cerca de los valores propios de un ecosistema terrestre, en un nivel trófico alto, por encima de los carnívoros. En el siguiente apartado se discutirá sobre la posible base de su alimentación.

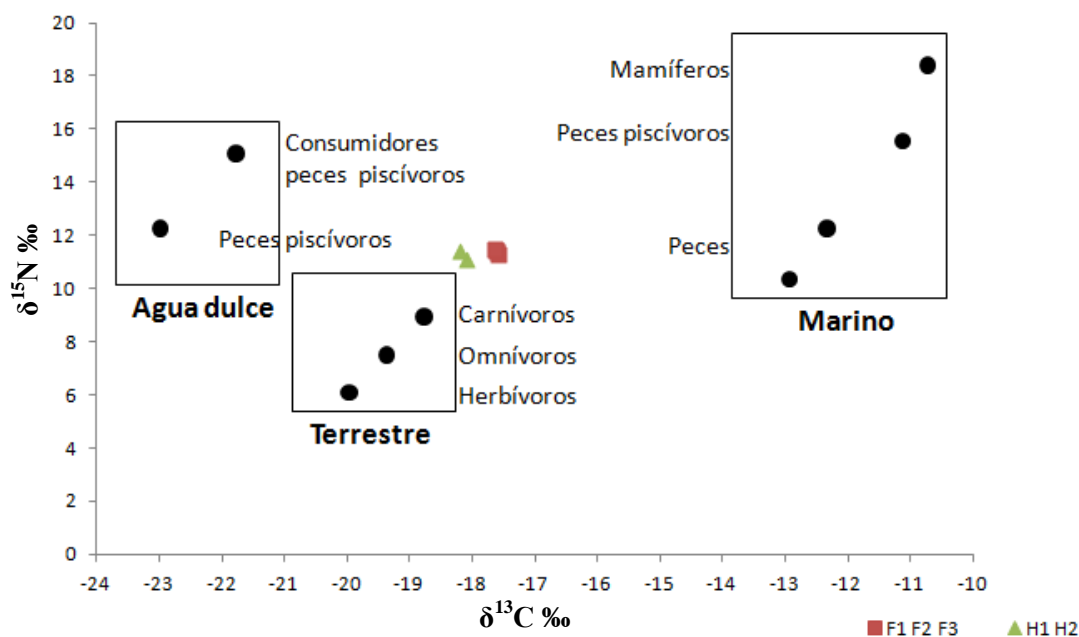


Figura 6. Gráfico en el que se representan los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ de las muestras tratadas (F1, F2, F3, H1 y H2) y los valores teóricos de determinados grupos de organismos pertenecientes a distintos ecosistemas según García Guixé, 2008.

- Análisis del contenido proteico a través de SDS-PAGE

Las imágenes que se recogen en la figura 5 corresponden a los geles de poliacrilamida cargados con el componente extraído en cada muestra y teñidos con Azul de Coomassie.

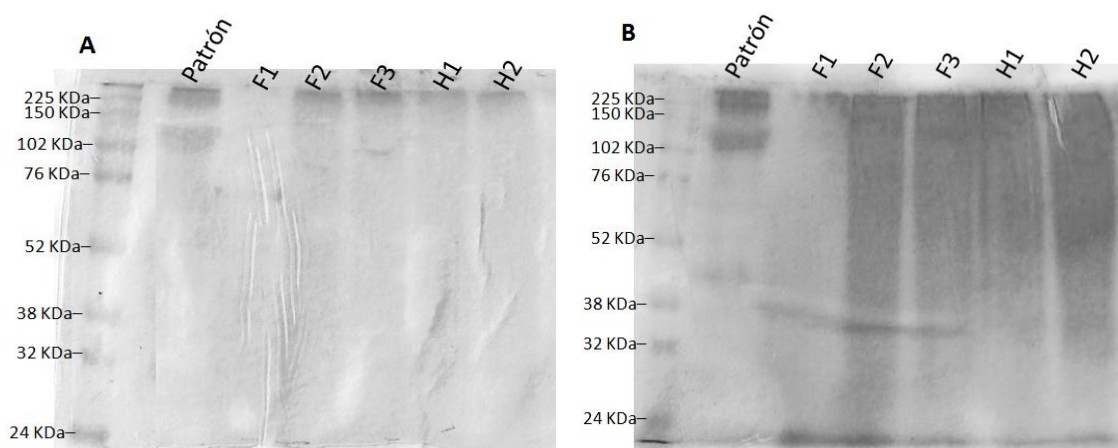


Figura 5. A) Gel cargado con 150 μg de proteína total extraída, teñido según el Método 1 con Azul de coomassie. B) Gel cargado con 180 μg de proteína total extraída, teñido con Azul de Coomassie según el Método 2. Cada método esta descrito en el apartado 3.

En ambos geles, se observa a la izquierda el patrón de peso molecular con el valor en KDa asociado a cada banda. Junto a él, a continuación, se encuentra el patrón de colágeno de placenta, que en A y en B exhibe una banda algo mayor de 102KDa.

Además en la segunda imagen (B) es posible identificar una banda en el rango de 38 – 52KDa. En cuanto a las muestras tratadas, ninguna de ellas presenta bandas, y en ambos geles, la línea por la que ha corrido F1 aparece pobremente teñida.

6. DISCUSIÓN

El primer procedimiento que se varió fue el molido del hueso, al no tener disponibilidad de un mortero eléctrico de ágata en el LAPP, se recurrió al molido de la muestra a mano con un mortero de hierro, lo que hizo que el grano del polvo obtenido fuese algo más grueso. Esto provocó que la reacción con HCl continuase una vez pasados los 20 minutos, alargando en la primera extracción el tratamiento con HCl. El siguiente paso modificado fue el rescate de la fase acuosa, en vez recurrir a la centrifugación se dejó que el residuo sólido sedimentase, y el colágeno solubilizado fue recogido con una pipeta. A continuación el filtrado se llevó a cabo con un filtro de 20µm adaptado a una jeringuilla, un diámetro de poro mayor que quizá tuviese consecuencias en la capacidad de eliminación de contaminantes no solubilizados. Por último la concentración de la muestra también sufrió modificaciones en cuanto a la temperatura (Tabla 2), responsable de las diferencias observadas en el aspecto de estas (Fig.4).

En cuanto a la apariencia de la cristalización, F3 y H1 son los que mejor aspecto presentan (Fig.4). Tanto en F1, F2 y H2, se observan burbujas, debido a la temperatura bajo la que se produjo la cristalización (80°C) (Tabla 2). Los resultados referidos al rendimiento han sido satisfactorios en todos los casos (Tabla 3). En el caso de F1 aunque muestre un rendimiento mayor, este dato no es fiable. Debido a una inclinación de la superficie sobre la que ha cristalizado la muestra, el aspecto que presenta no es homogéneo, y por la zona en la que se observa una mayor cantidad parece que no ha llegado a cristalizar completamente. El resto de muestras obtenidas han cristalizado por completo, por lo que los pesos obtenidos se consideran válidos. A partir de aquí es posible calcular el rendimiento de la extracción, o lo que es lo mismo, la concentración de colágeno presente en el hueso (Tabla 3). Según esto podemos considerar que el grado de preservación es adecuado (excluyendo a F1), teniendo en cuenta que en huesos modernos este puede llegar como mucho al 20-22% (Ambrose, 1990; van Klinken, 1999).

Además, se observa que el rendimiento en las extracciones realizadas en la UAM es casi un 3% mayor que el rendimiento obtenido en el Laboratorio de Geocronología (IQFR-CSIC) (excluyendo a F1) (Tabla 3). A priori puede pensarse que este aumento del rendimiento podría ser debido a una eliminación menos eficaz de los contaminantes, principalmente orgánicos. Para comprobar este efecto de contaminación se recurrió a la proporción de los elementos carbono y nitrógeno y a su ratio atómico (C:N).

Basándose en estudios en los que se ha realizado extracción de colágeno de huesos humanos modernos, se considera que la proporción de C debería encontrarse entre 35% y 40%, y la de N en torno al 15% (Ambrose, 1990; van Klinken, 1999). Los resultados obtenidos para el C, todos ellos con unos porcentajes próximos al 40% (Tabla 3) pueden considerarse válidos. Sin embargo, al comparar las muestras H1 y H2 estos valores varían en un 5% (Tabla 3). El menor contenido de C en la muestra H2 puede ser indicativo de una mayor degradación de la materia orgánica debido a la mayor temperatura a la que fue cristalizado el colágeno en la UAM. Para el N los valores obtenidos son más homogéneos (Tabla 3), y se ajustan perfectamente al valor establecido.

Referido a la relación atómica C:N, para aceptar una muestra como válida, habitualmente se considera que este valor debe encontrarse entre 2,9 y 3,6; teniendo en cuenta que la relación atómica C:N del colágeno de huesos modernos es 3,2 (Ambrose, 1990; DeNiro, 1985; van Klinken, 1999). Algunos investigadores, sin embargo, aceptan también valores comprendidos entre 2,6 y 3,4 (Schoeninger *et al.*, 1989). Si se sigue este último criterio, los valores obtenidos en la UAM, alrededor de 2,7 (Tabla 3), clasificarían a las muestras como válidas. Aún así, los datos indican una relación atómica C:N más baja en estas muestras que en la muestra de referencia H1 (C:N = 2,9), además de la diferencia de concentración de C entre las muestras H1 y H2; lo que lleva a plantear la posibilidad de que hubiese algún tipo de contaminación en las muestras extraídas en la UAM. Sin embargo, los resultados referidos a las relaciones isotópicas $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ presentan valores relativamente constantes para cada uno de los huesos (Tabla 3). La única diferencia que se observa es en el valor $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ entre los dos huesos, algo completamente lógico dado que el fémur (F) y el húmero (H) tratados corresponden a dos individuos distintos. Esto permite afirmar que las variaciones

observadas en la proporción de C y en la relación C:N entre las muestras no influyen en la relación isotópica de cada uno de ellos.

Acerca de la alimentación de los individuos a los que pertenecen los restos, los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ en conjunto estarían indicando una alimentación basada en recursos de origen terrestre (Fig.5). Además los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ indican un consumo predominante de plantas C3. En cuanto al nivel trófico, presentan valores de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ más elevados que los establecidos para los carnívoros, lo que podría estar indicando un consumo de carne frecuente. No obstante los valores de $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ están influenciados por otros muchos factores, especialmente climáticos (Larsen, 1999), por eso para llegar a hacer una reconstrucción de la dieta, no basta con realizar los análisis isotópicos sobre los restos de individuos de una población; también es necesario caracterizar isotópicamente las posibles fuentes de alimento de la época, procedimiento que en este caso no se ha hecho. Además, como se dijo en la introducción, los niveles de ^{15}N podrían estar influidos por cierta restricción nutricional, algo que en este caso no es posible valorar. Por este motivo los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ obtenidos en este análisis se consideran anecdóticos en lo referido a la alimentación, no así como indicadores de la calidad de la extracción de colágeno realizada.

Sobre la valoración del contenido proteico de la muestra extraída mediante electroforesis, no se ha observado ningún patrón de bandas que pueda identificarse con colágeno. En caso de que las moléculas de tropocolágeno estuviesen bien preservadas se esperaría encontrar al menos una banda en torno a 100KDa correspondiente con el peso molecular de sus cadenas peptídicas ($[\alpha-1]_2\alpha-2$). Los geles, sin embargo, no muestran ninguna banda en el rango de 225-24KDa (Fig.5). Por ello con este análisis no es posible afirmar la presencia de colágeno en la muestra, aunque tampoco puede negarse. De hecho es posible que debido al tratamiento con ácido clorhídrico y la elevada temperatura a la que se han sometido las muestras, la proteína se haya degradado hasta el punto de generar pequeños péptidos por debajo de 24KDa no presentes en el gel. También es posible que la degradación no solo se deba al tratamiento químico, sino a procesos diagenéticos. Para estudios futuros se tendrá en cuenta un nuevo método de extracción menos agresivo basado en un tratamiento con ácido acético en vez de clorhídrico y sin someterse a tan elevadas temperaturas, que puede mejorar incluso el rendimiento (Caputo *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta que el colágeno constituye el 90% de la fase orgánica del hueso, es lógico pensar que las muestras extraídas procedan en su mayoría de este componente. No obstante, el tratamiento químico utilizado en ningún momento es capaz de discriminar entre colágeno y el resto de proteínas, por lo que el componente extraído no es colágeno propiamente dicho. Aunque esto es reconocido por la mayoría de autores, el hecho es que esta denominación se ha mantenido en las publicaciones. Realmente esto no supone ningún problema en los estudios sobre alimentación de las poblaciones a partir de análisis isotópicos, ya que los estudios que han servido de base para determinar la relación existente entre esta y la composición isotópica del “colágeno” han sido realizados sobre el componente extraído con esta metodología o similares. La solución podría encontrarse en que el producto que se obtiene no debería denominarse colágeno, sino fracción proteica del hueso.

7. CONCLUSIONES

- La sustancia obtenida con el protocolo presentado en este trabajo, no puede afirmarse que proceda únicamente del colágeno presente en el hueso, sino que probablemente corresponda a parte del componente orgánico del hueso en el que se encuentran restos degradados de colágeno y otras proteínas.
- Las diferencias observadas en la concentración de carbono y nitrógeno en el componente extraído, así como su relación atómica, no influyen en la composición isotópica de estos elementos.
- La extracción del componente orgánico se ha realizado exitosamente, sin obtener contaminantes que influyan en las relaciones isotópicas de carbono y nitrógeno.
- Las ligeras adaptaciones que se han introducido (molido a mano con mortero de hierro, ausencia de centrifugado, y filtrado de 20µm) no afectan a la calidad de las muestras extraídas.
- El buen rendimiento obtenido en la extracción permite minimizar la destrucción de material óseo si lo que se pretende es determinar las relaciones isotópicas de carbono y nitrógeno, ya que para su análisis solo se requiere 1mg de muestra. No obstante el rendimiento va ligado al estado de conservación del hueso, por lo que será necesario valorar cada caso particular.

- Con todo ello, queda establecido en el LAPP un protocolo de extracción de la fracción orgánica de huesos arqueológicos basado el procedimiento empleado en el tratamiento de F3. Los pasos que recoge este procedimiento son:
 - **Desmineralización.** El hueso molido a mano es tratado con HCl 1,5M en una proporción 10:1 (v/p) respecto al peso de la muestra durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación.
 - **Lavado.** Adición de agua destilada y eliminación de la fase líquida. Repetición del procedimiento hasta que el líquido desechado no presente coloración
 - **Eliminación de contaminantes.** Tratamiento con NaOH 0,125M en una proporción 10:1 (v/p) respecto al peso de la muestra inicialmente tratada durante 20h con agitación a temperatura ambiente.
 - **Lavado.** Adición de agua destilada y eliminación de la fase líquida. Repetición del procedimiento hasta que el líquido desechado no presente coloración.
 - **Gelatinización.** Se deja que el componente orgánico se solubilice en agua a pH = 3, conseguida con la adición de HCl, durante 20h a 78°C con agitación.
 - **Rescate de la muestra solubilizada.** Se deja que el residuo sólido sedimente y se rescata la fase líquida con una pipeta. A continuación se filtra en un filtro de 20 μ m.
 - **Concentración.** Se deja concentrar la muestra a 70°C, de manera que se vaya evaporando. Cuando el volumen se ha reducido lo suficiente se cambia al recipiente en el que vaya a cristalizar, en este caso una placa Petri de 5mm de diámetro.
- Los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ obtenidos no permiten hacer una reconstrucción de la dieta, ya que al tratarse de un osario hay muchos aspectos de la población de origen que se desconocen (sexo, edad, cronología exacta; relación isotópica de los alimentos), además de contar únicamente con muestras de dos individuos.

De los objetivos planteados al inicio de este proyecto, la capacidad de aplicar un protocolo de extracción que permita obtener muestras de buena calidad y con un buen rendimiento, es ahora un hecho, lo que conlleva la posibilidad de cumplir el objetivo planteado a largo plazo, la creación de un banco de “colágeno”.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Una vez que el protocolo de extracción ha sido establecido, será necesario aumentar el tamaño muestral, de manera que pueda realizarse un análisis estadístico sobre los resultados obtenidos. Además, utilizando este como referencia, se abre la posibilidad de introducir cambios en el procedimiento de extracción (modificación de variables), o aplicar otras metodologías descritas en distintas publicaciones sobre datación por radiocarbono y análisis de isótopos estables, tratando de:

- mejorar el rendimiento de la extracción.
- emplear un tratamiento menos agresivo en el aislamiento de colágeno que permita su caracterización, bien mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, o bien mediante inmunodetección por *western-blot*

Otra línea de estudio podría ir encaminada a comprobar si variables propias de la biología de los individuos, tales como sexo, edad y patologías reconocibles en la anatomía esquelética del individuo, influyen en los valores $^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ de una población.

En cuanto a la reconstrucción de la dieta de poblaciones pasadas, si en estudios posteriores lo que persigue es esto, siempre que sea posible será preciso analizar también restos de las fuentes de alimento de la población estudiada. De este modo, los valores $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ y $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ de la fracción proteica del hueso podrán ser interpretados de una manera más rigurosa.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de distintas personas que se han mostrado siempre dispuestas a ayudarme en todo lo que he necesitado. En primer lugar, quisiera agradecer al Laboratorio de Geocronología (IQFR-CSIC), en especial a Antonio y Raúl, el que me hayan enseñado la metodología de extracción de colágeno, fundamental en este proyecto. Por supuesto, a la unidad de Fisiología Animal (Dpto. de Biología), concretamente a María José, que ha puesto a mi disposición los materiales necesarios para llevarlo a cabo. A Fran, Vanesa y Ramón del SIDI por atender todas mis dudas sobre la técnica de IRMS. A Silvia, que tanto me ha ayudado en las horas de laboratorio que hemos compartido.

9. REFERENCIAS

- Ambrose SH. Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. *Journal of Archaeological Science*. 1990; 17: 431-451.
- Ambrose SH, Krigbaum J. Bone chemistry and bioarchaeology. *Journal of Anthropological Archaeology*. 2003; 22: 193-199.
- Balter V, Simon L, Fouillet H, Lécuyer C. Box-modeling of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in mammals. *Oecologia*. 2006; 147: 212-222.
- Brown TA, Nelson DE, Vogel JS, Southon JR. Improved collagen extraction by modified Longin method. *Radiocarbon*. 1988; 30(2): 171-177.
- Caputo I, Lepretti M, Scarabino C, Esposito C, Proto A. An acetic acid-based extraction method to obtain collagen from archaeological bone remains. *Analytical Biochemistry*. 2012; 421: 92-96.
- Castaños J, Murelaga X, Castellanos I, Alonso-Olazabal A, Zuluaga MC, Ortega LA. Evaluación del grado de diagénesis en huesos fósiles mediante espectroscopía de infrarrojos. *Geogaceta*. 2010; 49: 11-14.
- DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1978; 42: 495-506.
- DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1981; 45: 341-351.
- DeNiro MJ, Schoeninger MJ. Stable carbon and nitrogen isotope ratios of bone collagen: Variations within individuals, between sexes, and within populations raised on monotonous diets. *Journal of Archaeological Science*. 1983; 10:199-203.
- DeNiro MJ. Postmortem preservation and alteration of in vivo bone collagen isotope ratios in relation to paleodietary reconstruction. *Nature*. 1985; 317(31): 806-809.
- Fry B. *Stable isotope ecology*. Springer. 2006.
- García Guixé E. Aplicación de los análisis de isótopos estables en la reconstrucción de la dieta de poblaciones humanas antiguas (paleodietas). En: Alcorlo P, Redondo R, Toledo J (editores). *Técnicas y aplicaciones multidisciplinares de los isótopos ambientales*. Ediciones UAM. 2008.

- Higham TFG, Jacobi RM, Ramsey CB. AMS radiocarbon dating of ancient bone using ultrafiltration. *Radiocarbon*. 2006; 48(2): 179-195.
- Hoefs J. Stable isotope geochemistry. 6^aed. Springer. 2009.
- Katzenberg MA. Advances in stable isotope analysis of prehistoric bones. En: Saunderson SR, Katzenberg MA (editores). *Skeletal biology of past peoples: research methods*. Wiley-Liss. 1992.
- Katzenberg MA, Lovell NC. Stable isotope variation in pathological bone. *International Journal of Osteoarchaeology*. 1999; 9: 316-324.
- Knudson KJ, Stojanowski CM. New directions in bioarchaeology: Recent contributions to the study of human social identities. *Journal of Archaeological Research*. 2008; 16: 397-432.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.
- Larsen CS. Isotopic and elemental signatures of diet and nutrition. En: Larsen CS. *Bioarchaeology: Interpreting behavior from the human skeleton*. Cambridge University Press. 1999.
- Larsen CS. Bioarchaeology: The lives and lifestyles of past people. *Journal of Archaeological Research*. 2002; 10(2): 119-166.
- Longin R. New method of collagen extraction for radiocarbon dating. *Nature*. 1971; 230: 241-242.
- Mays S, Elders J, Humphrey L, White W, Marshall P. Science and the Dead: A guideline for the destructive sampling of archaeological human remains for scientific analysis. Advisory Panel on the Archaeology of Burials in England. 2013.
- McCutchan Jr JH, Lewls Jr WM, Kendall C, McGrath CC. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*. 2003; 102: 378-390.
- O'Connor T. *The archaeology of animal bones*. Texas A&M University Press. 2008
- Ramsey CB, Higham T, Bowles A, Hedges R. Improvements to the pretreatment of bone at oxford. *Radiocarbon*. 2004; 46(1): 155-163.

- Reyes E. Geoquímica de Isótopos estables: Fundamentos, técnicas y aplicaciones. En: Barbero L, Mata MP (editores). Seminarios de la sociedad española de mineralogía, Vol 1: Geoquímica isotópica aplicada al medioambiente. Universidad de Cádiz: Sociedad española de mineralogía. 2004.
- Rodríguez Martínez J. Ecología. 2ªed. Pirámide. 2010.
- Ross MH, Pawlina W. Histología. 5ªed. Medica Panamericana. 2007.
- Schmidt-Schultz TH, Schultz M. Bone protects proteins over thousands of years: extraction, analysis, and interpretation of extracellular matrix proteins in archaeological skeletal remains. American Journal of Physical Anthropology. 2004; 123: 30-39.
- Schoeninger MJ, DeNiro MJ, Tauber H. Stable nitrogen isotope ratios of bone collagen reflect marine and terrestrial components of prehistoric human diet. Science. 1983; 220: 1381-1383.
- Schoeninger MJ, Moore KM, Murray ML, Kingston JD. Detection of bone preservation in archaeological and fossil samples. Applied Geochemistry. 1989; 4: 281-292.
- Taiz L, Zeiger E. Fisiología vegetal, Vol.1. 3ªed. Universitat Jaume I. 2006.
- Talwar GP, Srivastava LM (editores). Textbook of biochemistry and human biology. 3ªed. PHI Learning Pvt. Ltd., 2003.
- Tykot RH. Isotope Analyses and the Histories of Maize. En: Stable isotope analysis and human diet (II). Academic Press. 2006.
- Van Klinken GJ. Bone collagen quality indicators for paleodietary and radiocarbon measurements. Journal of Archaeological Science. 1999; 26: 687-695.
- Vogel JC, van der Merwe NJ. Isotopic evidence for early maize cultivation in New York State. American Antiquity. 1977; 42(2): 238-242.
- Welsch, U. Histología. 2ªed. Médica Panamericana. 2009.